

Voortgangsrapportage onderzoek naar Marfan syndroom

30 augustus 2018

Verslag resultaten promovendus Shaynah Wanga

Marfan Syndroom:

Het onderzoek van de promovenda beslaat het Marfan Syndroom. Marfan syndroom is een zeldzame bindweefselziekte die erfelijk is. De grote levens-slagader, de aorta, kan bij Marfan-patiënten op relatief jonge leeftijd (<40 jaar) ongemerkt enorm vergroten, waardoor een zogenaamd aneurysma ontstaat, dat plotseling kan scheuren waardoor de patiënt overlijdt.

De bijdrage van de stichting horstingstuit-foundation is besteedt aan 2 studies gericht op het beter begrijpen van aneurysma vorming, zodat er effectievere medicatie kan worden ontwikkeld en betere biomarkers beschikbaar komen om het ziektebeloop van de patiënt (het risico) beter in te schatten. Op dit moment is het vervangen van het aangedane deel van de aorta dmv chirurgie de beste behandeling, maar wel zeer intens. Bovendien weten we dat de ziekte langzaam verder gaat in de nog onaangedane delen van de aorta, waardoor soms meerdere malen deze grote chirurgische ingreep nodig is.

De eerste studie is reeds gepubliceerd en het tweede onderzoek is nu opgestuurd naar een gerenommeerd wetenschappelijk tijdschrift en daarvan verwachten we komende maand de kritische rapporten terug die we dan zullen beantwoorden.

In het eerste onderzoek zagen we in een Marfan muis model voor de ziekte dat er botvorming (zogenaamde calcificatie) optrad in de aorta. Dat er botvormende cellen ontstaan zegt iets over het ziekteproces dat zich af speelt in de aorta en geeft dus aan waar aangrijpingspunten zijn voor verder onderzoek. Deze calcificatie van de bloedvaten zien we vaak bij ouderen. Dus het lijkt erop dat de aorta in een versneld tempo verouderd, maar dan heel lokaal. Ook dit verouderingsproces is een aangrijpingspunt voor verder onderzoek. Op dit moment kijkt de arts alleen naar de aorta grootte om te bepalen wanneer aorta chirurgie nodig is. Maar vaak scheurt de aorta toch onverwacht op een plek waar de aorta normaal leek qua grootte. We kunnen het calcificatie proces goed visualiseren in de aorta van de muis en gaan in de nabije toekomst bekijken of we de calcificatie ook zichtbaar kunnen maken bij de Marfan patiënt om te zien of het een belangrijke biomarker voor aorta schade kan zijn, nog voordat de aorta verwijdt.

Publicatie calcificatie:

[J Pathol](#). 2017 Nov;243(3):294-306. doi: 10.1002/path.4949. Epub 2017 Sep 21.

Aortic microcalcification is associated with elastin fragmentation in Marfan syndrome.

[Wanga S](#)^{1,2,3}, [Hibender S](#)¹, [Ridwan Y](#)⁴, [van Roomen C](#)¹, [Vos M](#)¹, [van der Made I](#)⁵, [van Vliet N](#)⁴, [Franken R](#)³, [van Riel LA](#)¹, [Groenink M](#)^{3,6}, [Zwinderman AH](#)⁷, [Mulder BJ](#)³, [de Vries CJ](#)¹, [Essers J](#)^{4,8}, [de Waard V](#)¹.

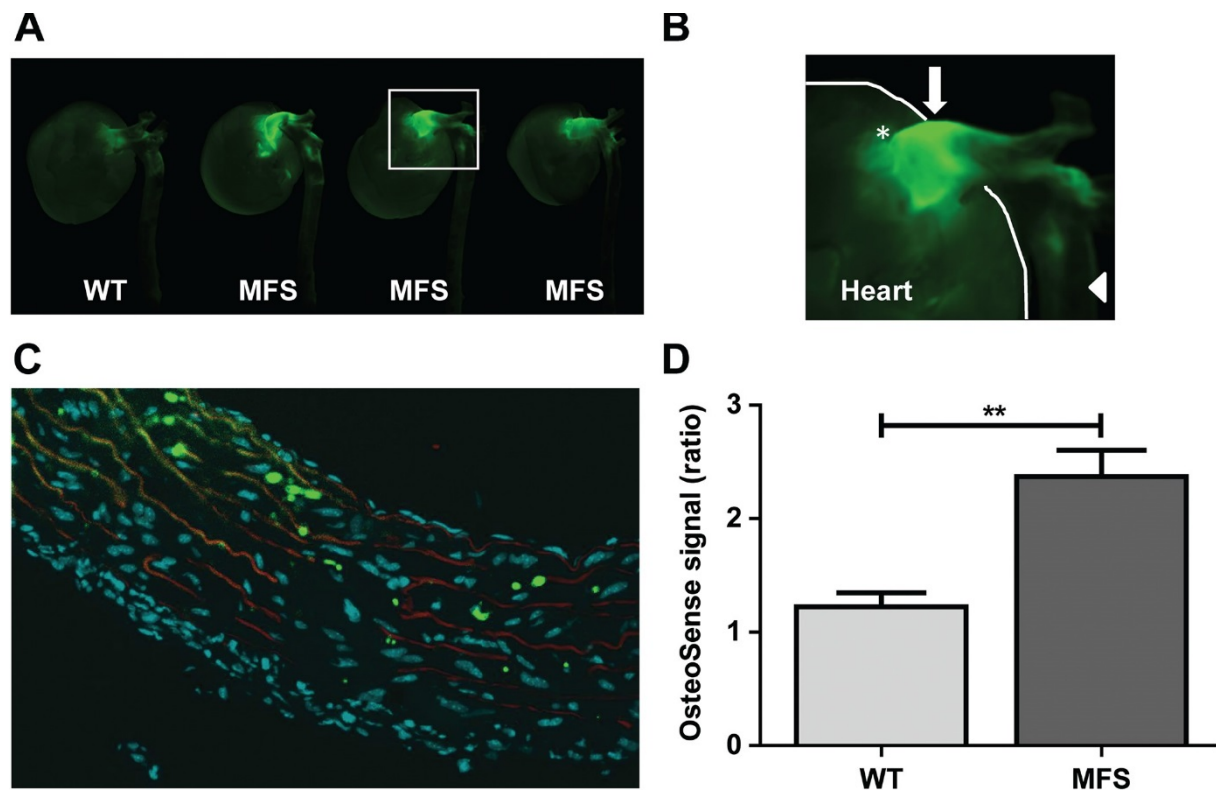
Abstract

Marfan syndrome (MFS) is a connective tissue disorder in which aortic rupture is the major cause of death. MFS patients with an aortic diameter below the advised limit for prophylactic surgery (<5 cm) may unexpectedly experience an aortic dissection or rupture, despite yearly monitoring. Hence, there is a clear need for improved prognostic markers to predict such aortic events. We hypothesize that elastin fragments play a causal role in aortic calcification in MFS, and that microcalcification serves as a marker for aortic disease severity. To address this hypothesis, we analysed MFS patient and mouse aortas. MFS patient aortic tissue showed enhanced microcalcification in areas with extensive elastic lamina fragmentation in the media. A causal relationship between medial injury and microcalcification was revealed by studies in vascular smooth muscle cells (SMCs); elastin peptides were shown to increase the activity of the calcification marker alkaline phosphatase (ALP) and reduce the expression of the calcification inhibitor matrix GLA protein in human SMCs. In murine Fbn1^{C1039G/+} MFS aortic SMCs, Alpl mRNA and activity were upregulated as compared with wild-type SMCs. The elastin peptide-induced ALP activity was prevented by incubation with lactose or a neuraminidase inhibitor, which inhibit the elastin

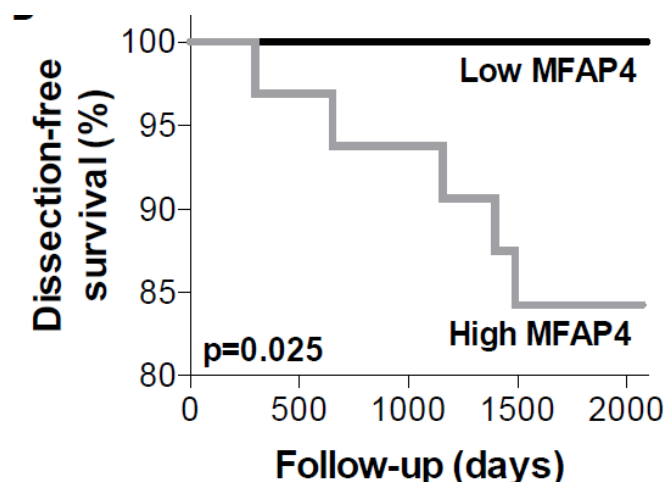
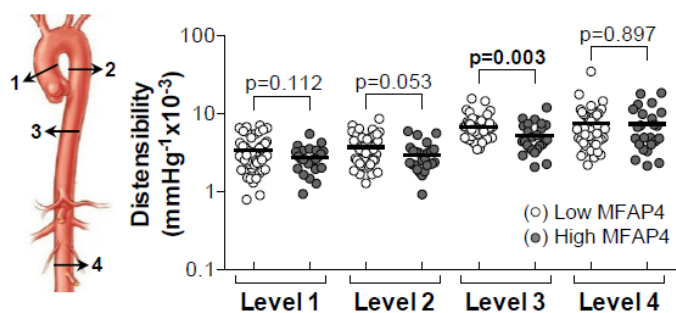
receptor complex, and a mitogen-activated protein kinase kinase-1/2 inhibitor, indicating downstream involvement of extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2) phosphorylation. Histological analyses in MFS mice revealed macrocalcification in the aortic root, whereas the ascending aorta contained microcalcification, as identified with the near-infrared fluorescent bisphosphonate probe OsteoSense-800. Significantly, microcalcification correlated strongly with aortic diameter, distensibility, elastin breaks, and phosphorylated ERK1/2. In conclusion, microcalcification co-localizes with aortic elastin degradation in MFS aortas of humans and mice, where elastin-derived peptides induce a calcification process in SMCs via the elastin receptor complex and ERK1/2 activation. We propose microcalcification as a novel imaging marker to monitor local elastin degradation and thus predict aortic events in MFS patients.

Copyright © 2017 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Figuur 4 (hieronder) uit het manuscript laat zien dat het aangedane deel van de aorta (dat uit het hart komt) bij de Marfan (MFS) muizen groen kleurt tov de controle (WT) muis.



In het tweede onderzoek dat naar verwachting eind 2018 of begin 2019 gepubliceerd zal worden, heeft de promovenda een eiwit gevonden dat met name in de aorta van Marfan patiënten voor komt en veel minder in een aneurysma van niet-Marfan patiënten. Dit eiwit heet microfibrillar associated protein-4 oftewel MFAP4. Voor dit onderzoek hebben we aorta materiaal van patiënten naar een collega in Londen gestuurd voor analyse. MFAP4 is ook in het bloed te meten en wij hebben gevonden dat hoge bloed MFAP4 waarden lijken te voorspellen of een Marfan patiënt een verhoogd risico loopt op scheuren van de aorta. MFAP4 lijkt dus een goeie biomarker in het bloed te zijn voor aorta schade. Om dat idee kracht bij te zetten hebben we gekeken naar de aorta stijfheid in relatie tot MFAP4. Aorta stijfheid geeft aan dat de elastische vezels in de aorta kapot zijn en dat er mogelijk calcificatie is opgetreden. Die aorta stijfheid (verlaagde distensibility) is inderdaad anders op 2 locaties (op level 2 en 3) in de aorta bij Marfan patiënten met een hoog MFAP4, zoals in de figuur hieronder. Deze twee locaties in de aorta zijn precies de locaties waar scheuren optreden zonder dat we dat van tevoren op basis van aorta grootte konden zien. In de survival grafiek zien we dat de mensen met een hoog MFAP4 in de tijd de aorta scheuren (dissections) krijgen. MFAP4 lijkt dus een interessante biomarker te zijn.



Publicatie MFAP4:

GLYCOPROTEOMIC ANALYSIS OF THE AORTIC EXTRACELLULAR MATRIX IN PATIENTS WITH MARFAN SYNDROME

Xiaoke Yin*¹, Shaynah Wanga*^{2,3}, Adam Fellows¹, Javier Barallobre-Barreiro¹, Ruifang Lu¹, Romy Franken³, Marika Fava¹, Ferheen Baig¹, Philipp Skroblin¹, Qiuru Xing¹, Dave R. Koolbergen⁴, Maarten Groenink^{3,5}, Aeilko H. Zwinderman⁶, Ron Balm⁷, Carlie J.M. de Vries², Barbara J.M. Mulder^{3,8}, Rosa Viner⁹, Marjan Jahangiri¹⁰, Vivian de Waard*², Manuel Mayr*¹

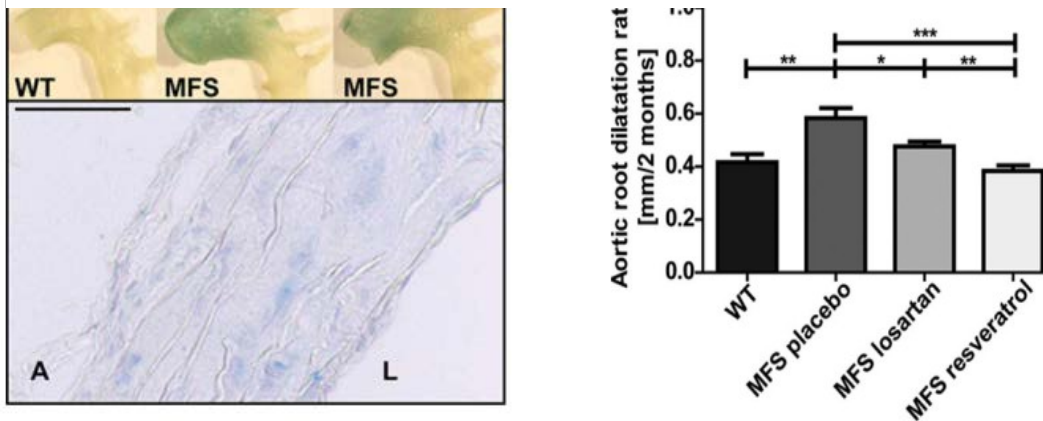
* These authors contributed equally as shared first and shared senior authors.

ABSTRACT

Rationale. Marfan syndrome (MFS) is a genetic disorder caused by mutations in fibrillin-1, an extracellular matrix (ECM) component which is regulated post-transcriptionally by glycosylation. This study aimed to characterise the glycoproteome of the aortic ECM from MFS patients. **Methods.** ECM extracts from aneurysmal ascending aortic tissue from patients with and without MFS were enriched for glycopeptides and changes in abundance were determined by mass spectrometry. **Results.** Direct glycopeptide analysis identified 141 glycoforms from 47 glycosites within 35 glycoproteins in the human aortic ECM. Notably, microfibril-associated glycoprotein 4 (MFAP4) showed increased and more diverse N-glycosylation in patients with MFS compared to control patients. MFAP4 transcript levels were markedly higher in MFS aortic tissue. MFAP4 protein levels were also increased at the predilection (convexity) site for ascending aneurysm in bicuspid aortic valve patients. MFAP4 plays a role in the organisation of fibrillin-1, which together with tropoelastin constitutes the mature elastic fibre. In human aortic smooth muscle cells, MFAP4 mRNA expression was induced by transforming growth factor beta 1 whereas siRNA knockdown of MFAP4 increased elastin but decreased fibrillin-1 expression. These ECM changes were accompanied by differential expression of proteases from a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family and their proteoglycan substrates, aggrecan and versican. Finally, higher concentrations of plasma MFAP4 in MFS patients were associated with a lower thoracic descending aorta distensibility and greater incidence of type B aortic dissection, thus having biomarker potential. **Conclusions.** Our glycoproteomics analysis revealed that MFAP4 glycosylation and not just expression is enhanced during the advanced, aneurysmal stages of MFS compared to control aneurysms from non-MFS patients. The application of glycoproteomics to clinical samples will be essential to obtain insights on the interaction of ECM components during disease.

Toekomstig Resveratrol onderzoek bij Marfan patiënten door promovendus Mitzi van Anandel

In de Marfan-muis hebben we gezien dat er sprake is van versnelde veroudering van de aorta in de Marfan muizen t.o.v. de controle muizen. Dat hebben we gezien aan de aorta calcificatie zoals hierboven eerder genoemd, maar ook met een meer specifieke verouderingsmarker; beta-galactosidase (zoals in de figuur hieronder uit onze publicatie in de groene kleur).



(publicatie: Resveratrol Inhibits Aortic Root Dilatation in the Fbn1C1039G/+ Marfan Mouse Model. Hibender S, Franken R, van Roomen C, Ter Braake A, van der Made I, Schermer EE, Gunst Q, van den Hoff MJ, Lutgens E, Pinto YM, Groenink M, Zwinderman AH, Mulder BJ, de Vries CJ, de Waard V. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016 Aug;36(8):1618-26. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307841.)

Er is een stofje bekend dat veroudering tegen gaat, wat veel gebruikt wordt in onderzoek met muizen. Het bracht ons op het idee om dit stofje, genaamd Resveratrol, ook te gaan gebruiken in Marfan muizen. En inderdaad zorgde Resveratrol ervoor dat de aorta van de Marfan muizen gedurende 2 maanden therapie niet vergrootte (zie grafiek hierboven). Het leek het zelfs beter te doen dan het middel losartan wat nu al gebruikt wordt bij Marfan patiënten. Aangezien niet alle Marfan patiënten even goed reageren op losartan zijn er meer medicamenteuze behandelingen nodig of wellicht zelfs combinatie therapie. In dat kader, en omdat Resveratrol een voedingssupplement is, konden we een studie bij Marfan patiënten ontwerpen dat direct in de kliniek mocht worden toegepast.

Dankzij een donatie van een Marfan familie en de donatie van de stichting Horstingstuit-foundation konden we in mei 2018 beginnen met dit onderzoek. We hebben een nieuwe promovenda, Mitzi van Anandel, aangenomen als arts-onderzoeker. Zij heeft de protocollen geschreven voor de Medisch Ethische commissie (METC) en inmiddels hebben we goedkeuring om te beginnen met rekruteren van AMC patiënten. Zij heeft ook contacten gelegd met de andere Marfan Centra in Nederland, zodat de goedkeuring van hun METC ook soepel zal verlopen. De Resveratrol capsules worden op dit moment gemaakt door een bedrijf en vanaf 1 oktober includeren we de eerste van 100 Marfan patiënten in de studie. De patiënten krijgen bovenop hun huidige medicatie gedurende 1 jaar Resveratrol. We zullen verschillende metingen uitvoeren aan het begin en aan het eind van de studie om het effect van Resveratrol te meten, op o.a. hartfunctie, aorta grootte, aorta stijfheid, MFAP4 in het bloed, ed. Het Resveratrol studie protocol dat we hebben geschreven voor de METC kan worden nagestuurd wanneer dat wenselijk is. Na verdere uitwerking van de studie is al wel gebleken dat we nog aanvullende subsidie zullen moeten werven in 2019, maar we zijn enorm verheugd dat we volgende maand van start gaan met de Marfan patiënten. We hebben op de nationale Marfan vereniging dag de studie aangekondigd en een stukje geschreven voor op hun website. We kregen enthousiaste reacties van Marfan patiënten, dus de betrokkenheid lijkt groot.

<https://www.marfansyndroom.nl/nieuws/480-onderzoek-naar-resveratrol-als-mogelijke-aorta-groeiremmer.html>